OIPE JC139
JUN 10 2004
PATENT & TRADEMARK OFFICE

IFW

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: Asahara et al.	
	Art Unit: 1651
Application No.: 10/760,283	Examiner: [to be assigned]
Filing Date: January 21, 2004	Atty. Docket: US-106
Title: Method for producing L-lysine using methanol-utilizing bacterium	

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119 IN UTILITY APPLICATION

Commissioner of Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), filed in a foreign country within one (1) year prior to the filing of the above-referenced United States utility patent application (35 U.S.C. § 172):

Country	Priority Document Appl. No.	Filing Date
Japan	2003-20513	January 29, 2003

A certified copy of each listed priority document is submitted herewith. Prompt acknowledgment of this claim and submission is respectfully requested.

Respectfully submitted,

Shelly Guest Cermak
Reg. No. 39,571

Date: June 10, 2004
PTO Customer Number: **000038108**
Ajinomoto Corporate Services, LLC
1120 Connecticut Avenue
Ste. 1010
Washington, D.C. 20036
202.457.0284

C-1580S

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: ２００３年　１月２９日

出願番号
Application Number: 特願２００３－０２０５１３

[ST. 10/C]: ［ＪＰ２００３－０２０５１３］

出願人
Applicant(s): 味の素株式会社

２００３年　７月１０日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office 太田信一郎

出証番号　出証特２００３－３０５６３４７

【書類名】　特許願
【整理番号】　P-B0647
【提出日】　平成15年 1月29日
【あて先】　特許庁長官殿
【国際特許分類】　C12P 13/08
【発明の名称】　メタノール資化性細菌を用いたＬ－リジンの製造法
【請求項の数】　7
【発明者】
【住所又は居所】　神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１　味の素株式会社内
【氏名】　淺原　貴之
【発明者】
【住所又は居所】　神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１　味の素株式会社内
【氏名】　平野　聖子
【発明者】
【住所又は居所】　神奈川県川崎市川崎区鈴木町１－１　味の素株式会社内
【氏名】　安枝　寿
【特許出願人】
【識別番号】　000000066
【氏名又は名称】　味の素株式会社
【代理人】
【識別番号】　100089244
【弁理士】
【氏名又は名称】　遠山　勉
【選任した代理人】
【識別番号】　100090516
【弁理士】
【氏名又は名称】　松倉　秀実

【選任した代理人】

【識別番号】　100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】　川口　嘉之

【連絡先】　０３－３６６９－６５７１

【手数料の表示】

【予納台帳番号】　012092

【納付金額】　21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】　明細書　1

【物件名】　要約書　1

【プルーフの要否】　要

【書類名】　明細書

【発明の名称】　メタノール資化性細菌を用いたＬ－リジンの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項１】　生育にＬ－メチオニンを要求し、かつ、Ｌ－リジン生産能を有するメタノール資化性細菌を、メタノールを主要炭素源とする培地に培養し、培養物中にＬ－リジンを生産蓄積させ、該培養物からＬ－リジンを採取することを特徴とするＬ－リジンの製造法。

【請求項２】　メタノール資化性細菌がメチロフィラス属細菌である請求項１に記載のＬ－リジンの製造法。

【請求項３】　メチロフィラス属細菌がメチロフィラス・メチロトロファスである請求項２に記載のＬ－リジンの製造法。

【請求項４】　メチロフィラス属細菌が、ジアミノピメリン酸合成酵素活性が増強され、かつ、Ｌ－リジン排出系が増強されるように改変されている請求項１～３のいずれか一項に記載のＬ－リジンの製造法。

【請求項５】　生育にＬ－メチオニンを要求し、かつ、Ｌ－リジン生産能を有するメチロフィラス属細菌。

【請求項６】　メチロフィラス・メチロトロファスである請求項５に記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項７】　ジアミノピメリン酸合成酵素活性が増強され、かつ、Ｌ－リジン排出系が増強されるように改変されている請求項５又は６に記載のメチロフィラス属細菌。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は微生物工業に関連したものであり、詳しくは、発酵法によるＬ－リジンの製造法に関するものである。

【０００２】

【従来の技術】

Ｌ－リジンは、コリネバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属等に属す

る微生物を用いた発酵法により生産されている（非特許文献１参照）。これらの微生物は生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の栄養要求性変異株等の人工変異株が用いられている。また組換えＤＮＡ技術によりＬ－リジンの生合成酵素を増強することによって、Ｌ－リジンの生産能を増加させる種々の技術が開示されている（特許文献１参照）。

【０００３】

上記のような微生物の育種や製造法の改良により、Ｌ－リジンの生産性はかなり高まってはいるが、今後の需要の一層の増大に応えるためには、さらに安価かつ効率的なＬ－リジンの製造法開発が求められている。

【０００４】

ところで、従来安価に大量に入手可能な発酵原料であるメタノールからの発酵法によりＬ－アミノ酸を製造する方法としては、アクロモバクター属およびシュードモナス属（特許文献２）、プロタミノバクター属（特許文献３）、プロタミノバクター属及びメタノモナス属（特許文献４）、ミクロサイクラス属（特許文献５）、メチロバチラス属（特許文献６）、バチラス属（特許文献７）、メチロフィラス属（特許文献８）などに属する微生物を用いる方法が知られている。

【０００５】

一方、偏性メタノール資化菌、特にメチロフィラス属細菌では、通常の方法では、栄養要求性変異株を取得することが困難といわれてきた（非特許文献２、３）。そのため、例えば、グルタミンの要求性株の取得では、その要求性が温度感受性になったもの（非特許文献４）しか取れなかったり、特別な手法（DNAの変異剤を含む溶液に、菌株を懸濁し、それに電圧を印加し、強制的に細胞膜に穴をあけて、変異剤を流し込むという手法（エレクトロポレーション））を駆使しても、ようやく、葉酸要求株、セリンとアラニンの同時要求株、そしてグルタミン酸とイノシトールの同時要求株の３種類の変異株を取得できたにすぎなかった（非特許文献５）。

【０００６】

なお、前記特許文献８には、メチロフィラス・メチロトロファスに化学的な変異剤による変異誘発処理を行い、リーキー（leaky）なカザミノ酸要求株を取得

して、その株がバリン、ロイシン、イソロイシンを生産することが示されている。しかしながら、その変異株の特性から判断するに、それは細胞膜の変化により培地中の各種アミノ酸が細胞中へ透過することによるカザミノ酸のリーキー要求株と思われる。

【０００７】

【特許文献１】

国際公開第95/16042号パンフレット

【特許文献２】

特公昭45-25273号公報

【特許文献３】

特開昭49-125590号公報

【特許文献４】

特開昭50-25790号公報

【特許文献５】

特開昭52-18886号公報

【特許文献６】

特開平4-91793号公報

【特許文献７】

特開平3-505284号公報

【特許文献８】

国際公開第00/61723号パンフレット

【非特許文献１】

「アミノ酸発酵」相田浩　他、編、（株）学会出版センター、１９８６年５月３０日初版発行

【非特許文献２】

A.T. Moore et al., Journal of General Microbiology (1983), 129巻, pp785-799、

【非特許文献３】

O' Connor M.L. and Hanson R.S., Journal of General Microbiology (1978),

104巻,pp105-111

【非特許文献４】

Windass J.D. et al., Nature, 287, pp396-401

【非特許文献５】

C.S.Kim and T.K.Wood, Aplied Micronio1. Biotechnology (1997), 48, pp105-108

【０００８】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、メタノール資化性細菌を用いたＬ－リジン製造の効率を向上させる方法を提供することを課題とする。

【０００９】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、メタノール資化性細菌にＬ－メチオニン要求性を付与することに成功し、さらに、この性質により、メタノール資化性細菌によるメタノールからのＬ－リジン生産性が向上することを発見し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

（１）生育にＬ－メチオニンを要求し、かつ、Ｌ－リジン生産能を有するメタノール資化性細菌を、メタノールを主要炭素源とする培地に培養し、培養物中にＬ－リジンを生産蓄積させ、該培養物からＬ－リジンを採取することを特徴とするＬ－リジンの製造法。

（２）メタノール資化性細菌がメチロフィラス属細菌である（１）に記載のＬ－リジンの製造法。

（３）メチロフィラス属細菌がメチロフィラス・メチロトロファスである（２）に記載のＬ－リジンの製造法。

（４）メチロフィラス属細菌が、ジアミノピメリン酸合成酵素活性が増強され、かつ、Ｌ－リジン排出系が増強されるように改変されている（１）～（３）のいずれかに記載のＬ－リジンの製造法。

（５）生育にＬ－メチオニンを要求し、かつ、Ｌ－リジン生産能を有するメチロ

フィラス属細菌。

（６）メチロフィラス・メチロトロファスである（５）に記載のメチロフィラス属細菌。

（７）ジアミノピメリン酸合成酵素活性が増強され、かつ、Ｌ－リジン排出系が増強されるように改変されている（５）又は（６）に記載のメチロフィラス属細菌。

【００１０】

なお、本明細書において「Ｌ－リジン生産能」とは、本発明の細菌を培地に培養したときに、培地中に有意な量、例えば0.1g/L以上のＬ－リジンを蓄積する能力、または、菌体中の遊離Ｌ－リジン含量が有意な量、例えば、元の野生株に比べ、菌体の全タンパク質量あたりの遊離Ｌ－リジン量を1.5倍以上に増加させる能力をいう。

【００１１】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【００１２】

＜１＞本発明の細菌

本発明の細菌は、生育にＬ－メチオニンを要求し（Ｌ－メチオニン要求性）、かつ、Ｌ－リジン生産能を有するメタノール資化性細菌である。本発明においてメタノール資化性細菌、即ち、メチロトローフとは、メタノールを主たる炭素源として生育することができる細菌であって、Ｌ－メチオニン要求性を付与することによって、Ｌ－リジン生産能を獲得することができるか、又はＬ－リジン生産能が向上され得る細菌である。具体的には、メチロフィラス・メチロトロファス（Methylophilus methylotrophus）等のメチロフィラス属細菌、及び、メチロバチラス・グリコゲネス（Methylobacillus glycogenes）、メチロバチラス・フラゲラタム(Methylobacillus flagellatum)等のメチロバチラス属細菌が挙げられる。

【００１３】

メチロフィラス・メチロトロファスとしては、AS1株（NCIMB10515）等が挙げ

られる。メチロフィラス・メチロトロファスAS1株（NCIMB10515）は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストゥリアル・アンド・マリン・バクテリア（National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom）から入手可能である。

【００１４】

また、メチロバチラス・グリコゲネスとしては、T-11株（NCIMB 11375）、ATCC 21276株、 ATCC 21371株、ATR80株（Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994)、42巻, p67-72に記載）、A513株（Appl. Microbiol. Biotechnol., (1994)、42巻, p67-72に記載）等が挙げられる。メチロバチラス・グリコゲネスNCIMB 11375株は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストゥリアル・アンド・マリン・バクテリア（National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom）から入手可能である。また、メチロバチラス・フラゲラタムとしては、KT株（Arch. Microbiol., (1988), 149巻、p441-446に記載）等が挙げられる。

【００１５】

生育にＬ－メチオニンを要求し、かつＬ－リジン生産能を有するメタノール資化性細菌は、生育にＬ－メチオニンを要求しない（Ｌ－メチオニン非要求性）メタノール資化性細菌を出発材料として誘導することができる。生育にＬ－メチオニンを要求しないメタノール資化性細菌としては、メタノール資化性細菌の野生株が挙げられる。

【００１６】

本発明において、「生育にＬ－メチオニンを要求」するとは、例えば、Ｌ－メチオニンを含まないか、又はＬ－メチオニンの含有量が0.001g/L以下のSEII培地で、３０℃～３７℃の温度にて２日間培養したときに、増殖しないが、同培地にＬ－メチオニンを少なくとも0.05g/L以上添加した培地で培養したときに、野生株もしくは非改変株又は親株と同程度か、又はこれらの菌株の５％以上、好ましくは20%以上の増殖速度（単位時間当たりの菌体質量の増加）で増殖することを

いう。また、Ｌ－メチオニンを加えないSEII寒天培地上では、その目的株（Ｌ－メチオニン要求株）を、通常のプレートの表面に１００個程度を塗布し、３７℃にて２日間培養した後にも、直径が１ｍｍ以上のコロニーを形成できないが、同培地にL-メチオニンを1g/L添加した同寒天培地上には、同条件の培養後に直径が１ｍｍ以上のコロニーを形成しうる能力をもつ株は、「生育にＬ－メチオニンを要求」する株である。

【００１７】

Ｌ－メチオニン非要求株からＬ－メチオニン要求株を誘導するには、例えば、遺伝子に突然変異を誘起させることができる紫外線、X線、γ線などの物理的な刺激や、N－メチル－N'－ニトロ－N－ニトロソグアニジン（NTG）などの化学変異誘発剤によりＬ－メチオニン非要求株を処理し、Ｌ－メチオニンを要求するようになった株を選択する方法が挙げられるが、これらの中では、例えばNTGを用いる方法が好ましい。従来、メチロフィラス・メチロトロファスにおいては、特定のアミノ酸要求株を取得することが非常に困難と考えられていたが、本発明者らは、Ｌ－メチオニン要求株をこのような化学変異誘導剤によっても取得できることを見い出した。

【００１８】

一方、メタノール資化性細菌のＬ－メチオニン合成に関わる代謝経路が推定でき、その経路上の酵素をコードする遺伝子が判明している場合は、直接にその標的となる遺伝子を、相同組換えを利用した遺伝子破壊法により破壊することで、Ｌ－メチオニン要求性株が取得できる。また、遺伝子組換え技術を利用して、Ｌ－メチオニン合成に関わる酵素活性を抑制することによっても、Ｌ－メチオニン要求性を付与することができる。例えば、メチロフィラス・メチロトロファスの場合、配列表の配列番号１５に示す塩基配列を有するmetA遺伝子が、破壊または活性を抑制する酵素の遺伝子の一例である。この遺伝子は、ホモセリンｏ－アセチルトランスフェラーゼをコードしていると思われる。後述するように、metA遺伝子を破壊したメチロフィラス・メチロトロファスは、Ｌ－メチオニンを要求し、かつ、Ｌ－リジン生産性が向上した。

【００１９】

その他、酵素機能の欠損により、Ｌ－メチオニン要求性を付与する酵素の例としては、アスパラギン酸セミアルデヒドからＬ－メチオニンに至る代謝経路上の酵素が挙げられる。尚、「酵素機能の欠損」とは、酵素活性が実質的に完全に消失している場合に加えて、細菌がＬ－メチオニン要求性を示す程度に酵素活性が低下していることを含む。例えば、ホモセリン脱水素酵素の欠損の場合は、表現型はＬ－メチオニンとＬ－スレオニンの要求性と予想されるし、更には、ｏ－サクシニルホモセリンスルフィドリラーゼ（例えば、metZ遺伝子産物）やメチオニンシンターゼ（例えばmetEやmetHなど）の欠損でも、表現型はＬ－メチオニン要求性になると思われる。但し、それらの内で、同一の酵素反応を担う酵素が、メタノール資化性細菌中に複数個存在する場合（例えば、metEとmetHのように、同一酵素反応を触媒する酵素が、別個に存在する場合など）は、それら両酵素の機能を、同時に欠損させておくことが好ましい。

【００２０】

以下に、Ｌ－メチオニン合成系酵素の活性を欠損させる方法を、metA遺伝子を例として説明する。尚、metA遺伝子は、同遺伝子を保持する微生物、例えばメチロフィラス・メチロトロファスのゲノムDNAから、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法（以下、「PCR」と記す）法により同遺伝子を増幅することで取得することができる。ゲノムDNAは、公知の方法により調製することができる。PCRに用いるプライマーとしては、配列表配列番号７と１０で示したDNA配列をもつオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【００２１】

metA遺伝子の発現を抑えるための手段としては、例えば、この遺伝子のプロモーター配列中に１つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせ、プロモーター活性を低下させることによって転写レベルで遺伝子の発現を抑える方法がある（M. Rosenberg and D. Court, Ann. Rev. Genetics 13（1979）p.319、P. Youderian, S. Bouvier and M. Susskind, Cell 30 (1982) P. 843-853参照）。また、metA遺伝子の発現は、ＳＤ配列（シャイン-ダルガーノ配列）と開始コドンとの間の領域中に、１つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることによって、翻訳レベルでMetAタンパク質の

発現を抑えることができる（J. J. Dunn, E. Buzash-Pollert and F. W. Studier, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75 (1978) P.2743参照）。

【００２２】

また、ホモセリン o-アセチルトランスフェラーゼ酵素の比活性を低下又は消失させるには、metA遺伝子のコーディング領域の中の塩基配列中に１つまたは複数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせることによってコーディング領域を改変または破壊する方法がある。

【００２３】

遺伝子中に塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位を起こさせるには、具体的には、部位特異的変異法（Kramer, W. and Frits, H. J., Methods in Enzymology, 154, 350(1987)）や、目的遺伝子を含むＤＮＡを次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等の化学薬剤により処理する方法（Shortle, D. and Nathans, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 270(1978)）が挙げられる。

【００２４】

部位特異的変異法は、合成オリゴヌクレオチドを用いる方法であり、任意の限定された塩基対のみに、任意の置換、欠失、挿入、付加または逆位を導入できる手法である。この方法を利用するには、まず、クローン化され、ＤＮＡ塩基配列が決定されている目的遺伝子を持つプラスミドを変性させて１本鎖を調製する。次に、変異を起こさせたい部分に相補的な合成オリゴヌクレオチドを合成するが、このとき合成オリゴヌクレオチドを完全に相補的な配列にせず、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つようにしておく。この後、前記１本鎖ＤＮＡと任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つ合成オリゴヌクレオチドをアニールさせ、さらにＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウフラグメントとＴ４リガーゼを用いて完全な２本鎖プラスミドを合成し、これをエシェリヒア・コリのコンピテントセルに導入する。このようにして得られた形質転換体の幾つかは、任意の塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位が固定された目的遺伝子を含むプラスミドを持っている。

【００２５】

遺伝子に変異を導入し、改変または破壊することができる同様な手法には、リ

コンビナントＰＣＲ法（PCR Technology, Stockton press(1989)）がある。

また、化学薬剤処理を用いる方法は、目的の遺伝子を含むＤＮＡ断片を直接次亜硫酸ナトリウム、ヒドロキシルアミン等で処理することによりＤＮＡ断片中にランダムに塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つ変異を導入する方法である。

【００２６】

以上のようにして取得した変異が導入されて改変または破壊された遺伝子を、メタノール資化性細菌の染色体上の正常な遺伝子と置換することにより、細胞中のmetA遺伝子の発現を抑えることができる。

【００２７】

遺伝子の置換の方法としては、相同性組換えを利用した方法（Experiments in Molecular Genetics, Cold Sprlng Harbor Laboratory press(1972);Matsuyama, S.and Mizushima, S., J. Bacteriol., 162, 1196(1985)）がある。相同性組換えは、メタノール資化性細菌が一般的に持つ能力であり、染色体上の配列と相同性を有する配列を持つプラスミド等が菌体内に導入されると、ある頻度で相同性を有する配列の箇所で組換えを起こし、導入されたプラスミド全体を染色体上に組み込む。この後、さらに染色体上の相同性を有する配列の箇所で組換えを起こすと、再びプラスミドが染色体上から抜け落ちるが、この時組換えを起こす位置により変異が導入された遺伝子の方が染色体上に固定され、元の正常な遺伝子がプラスミドと一緒に染色体上から抜け落ちることもある。このような菌株を選択することにより、塩基置換、欠失、挿入、付加または逆位を持つ変異が導入されて改変または破壊された遺伝子が染色体上の正常な遺伝子と置換された菌株を取得することができる。

【００２８】

また、メチロフィラス・メチロトロファスにおいては、染色体上の目的遺伝子と相同な遺伝子を、直鎖状DNA断片の形態で導入することにより、細胞内で染色体上の目的遺伝子と導入した直鎖状DNA断片上の相同な遺伝子との間で相同組換えが起こり、遺伝子置換ができることを本発明者らは見い出しており、このような手法も適用可能である。なお、この手法により遺伝子の置換を行った例を、後

記実施例に記載している。

【００２９】

遺伝子置換が意図したように進行したことが判別できるように、例えば抗生物質に対する薬剤耐性マーカー遺伝子を、導入DNA断片中に組み込んでもよい。但し、そのようなマーカー遺伝子は、薬剤耐性マーカーを使用する場合は、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、アンピシリン、ストレプトマイシンなどの薬剤に対する耐性をメチルフィラス属細菌に付与する遺伝子が使用される。上記のようなマーカー遺伝子は、導入遺伝子中に挿入されることによって、コード領域が破壊された遺伝子の作製に用いることができる。尚、マーカー遺伝子が挿入された破壊型遺伝子は、後記実施例に示すようにプラスミドDNAを用いた遺伝子組換え手法によって作製してもよいが、クロスオーバーPCRにより導入遺伝子の増幅とマーカー遺伝子の挿入を同時に行うことによっても、作製することができる。

【００３０】

後述の実施例においては、metA遺伝子の機能が破壊されたメチロフィラス・メチロトロファス株の造成は、そのコーディング領域の一部を欠失させ、代わりにカナマイシン耐性遺伝子を挿入したmetA遺伝子を、上記の相同性組換えを利用した方法により、メチロフィラス・メチロトロファスの染色体上のmetA遺伝子と置換することにより行った。

【００３１】

本発明の細菌は、Ｌ－リジン生産能を有するメタノール資化性細菌に、上記のようにしてＬ－メチオニン要求性を付与することにより、取得することができる。また、Ｌ－メチオニン要求性を有するメタノール資化性細菌に、Ｌ－リジン生産能を付与することによっても、本発明の細菌を取得することができる。Ｌ－リジン生産能を有するメタノール資化性細菌、例えばメチロフィラス・メチロトロファス菌株は、Ｌ－リジン生産能を有しないか、又はＬ－リジン生産能が低い株に、変異処理を施し、Ｓ－（２－アミノエチル）－Ｌ－システイン（以下、「ＡＥＣ」と記す）等のリジンアナログに対する耐性を付与することにより取得することができる。変異処理の方法としては、前述のＬ－メチオニン要求株の取得と

同様に、菌株に、紫外線、X線、γ線などの物理的な刺激や、NTGなどの化学変異誘発剤による処理を施す方法がある。このようにして得られるＬ－生産能を有するメチロフィラス属細菌の具体例としては、メチロフィラス・メチロトロファス AJ13608が挙げられる。　本菌株は、メチロフィラス・メチロトロファスAS1株にＡＥＣ耐性を付与することによって育種されたものである。尚、メチロフィラス・メチロトロファス AJ13608は、1999年6月10日付で工業技術院生命工学工業技術研究所（現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６)）に受託番号FERM P-17416として寄託され、2000年3月31日付にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-7112が付与されている。

【００３２】

また、Ｌ－リジン生産能を有するメチロフィラス属細菌は、Ｌ－リジンの生合成に関与する遺伝情報を担うＤＮＡを遺伝子組換え技術により導入、増強することによっても育種することができる。導入される遺伝子は、例えば、ジヒドロジピコリン酸合成酵素、スクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼ等、Ｌ－リジンの生合成経路上の酵素をコードする遺伝子である。ジヒドロジピコリン酸合成酵素（DDPS）のようにＬ－リジンによるフィードバック阻害を受ける酵素遺伝子の場合には、かかる阻害が解除された酵素をコードする変異型遺伝子を用いることが望ましい。このような変異遺伝子としては、例えば、国際公開第95/16042号パンフレットに記載のE. coliのdapA*24遺伝子（118位のヒスチジン残基がチロシン残基で置換されたDDPSをコードしている）などが挙げられる。上記のその他の遺伝子についても、同パンフレットに詳述されている。尚、同パンフレットでは、テトラヒドロジピコリン酸スクシニラーゼをコードする遺伝子とスクシニルジアミノピメリン酸トランスアミナーゼをコードする遺伝子が入れ替わって記載されている。

【００３３】

また、Ｌ－アミノ酸の菌体外への排出に関与するタンパク質の活性を強化することによっても、Ｌ－アミノ酸生産能を向上させることができる。例えば、Ｌ－リジンの細胞外への排出に関与するタンパク質としては、lysE遺伝子によってコ

ードされるLysEタンパク質が知られている（Vrljic, M., Sahm, H. and Eggeling, L. (1996) Mol. Microbiol. 22, 815-826、国際公開第97/23597号パンフレット）。尚、本発明者らは、ブレビバクテリウム属細菌に由来する野生型lysE遺伝子は、メチロフィラス属細菌やメチロバチラス属細菌中では全く機能しないが、メチロトローフで機能するような改変が可能であることを確認している。このようなlysEタンパク質の改変体としては、後記実施例に示すlysE24が挙げられる。

【００３４】

lysE遺伝子がコードするLysEタンパク質は、６個の疎水性ヘリックス領域を有している。それらの疎水性ヘリックス領域のいくつかは膜貫通領域であると推定される。また、Ｎ末端から３番目と４番目の疎水性ヘリックス領域の間の領域は親水性であり、ループ構造をとると推定される。この親水性領域を本願発明においてはループ領域と呼ぶ。ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの野生型lysEの塩基配列及びLysEタンパク質のアミノ酸配列を、配列番号１７及び１８に示す。同アミノ酸配列において、疎水性ヘリックス領域は、５～２０、３７～５８、６７～９３、１４６～１６８、１８１～２０３、２１１～２３２に相当する。また、ループ領域は９４～１４５に相当する。

【００３５】

本発明者らは、lysE遺伝子はメタノール資化性細菌においては致死的に働くが、ループ領域を持たない、あるいは実質的に疎水性ヘリックスのみからなるLysEタンパク質の改変体をコードするＤＮＡは、メタノール資化性細菌のＬ－リジン及び／又はＬ－アルギニンの細胞外への排出を促進することを見い出した。lysE24は、このような野生型LysEタンパク質が持つループ領域を持たない変異型LysEタンパク質、又は実質的に疎水性ヘリックスのみからなる変異型LysEタンパク質をコードする。

【００３６】

上記のような変異型lysEとしては、少なくとも一つ又は二つ以上の疎水性ヘリックスを有し、メタノール資化性細菌に導入したときにＬ－リジンもしくはＬ－アルギニン又はこれらの両方のＬ－アミノ酸の細胞外への排出を促進するものであれば特に制限されないが、具体的にはＮ末端から１番目～６番目の疎水性ヘリ

ックスのすべてを有する変異型LysEをコードするＤＮＡが挙げられる。より具体的には、Ｎ末端から１番目～３番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、４番目～６番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとをコードするＤＮＡが挙げられる。前記lysE24は、このような１番目～３番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、４番目～６番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドとをコードする変異型lysEの一例である。lysE24遺伝子には、３番目の疎水性ヘリックスをコードする領域の下流に終止コドンが変異により導入されているが、この終止コドンよりも下流の領域を欠失させると、lysE24遺伝子を導入したメチロフィラス・メチロトロファスAS1株はＬ－リジンを培地中に蓄積しないことを、発明者らは確認している。このことから、１番目～３番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドと、４番目～６番目の疎水性ヘリックスを含むペプチドがそれぞれ別個に翻訳され、メタノール資化性細菌中で機能しているものと推定される。いずれにしても、lysE24遺伝子をメタノール資化性細菌に導入すれば、Ｌ－リジン又はＬ－アルギニンの生産量が向上する。

【００３７】

前記のようなＬ－リジンの細胞外への排出に関与するタンパク質をコードするＤＮＡ、すなわちlysE遺伝子またはその相同遺伝子の供与微生物としては、それらの遺伝子の改変体がメタノール資化性細菌中でＬ－リジン排出活性を発現することができるものを保持する微生物であれば、いかなる微生物でも利用できる。具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム等のコリネ型細菌、エシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属細菌、シュードモナス・アエルジノーサ等のシュードモナス属細菌、マイコバクテリウム・ツベルクロシス等のマイコバクテリウム属細菌等が挙げられる。

【００３８】

メタノール資化性細菌においてアミノ酸の排出遺伝子又はＬ－リジン生合成系遺伝子の発現を増強する場合は、その遺伝子断片を、メタノール資化性細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して、組換えDNAを作製し、これをメタノール資化性細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。あるいは、トランスポゾンに搭載し、染色体への組み込みにより、また、メタノー

ル資化性細菌内で強力転写を誘導するようなプロモーターを、その遺伝子の上流に連結させることも可能である。

【００３９】

メチロフィラス属細菌に遺伝子を導入、増強するには、メチロフィラス属細菌細胞内で自律複製可能なベクターに遺伝子を連結して組換えＤＮＡを作製し、それでメチロフィラス属細菌を、例えばエレクトロポレーション法などにより形質転換する方法があり、その他にトランスダクション、トランスポゾン（Berg, D. E. and Berg, C. M., Bio/Technol. 1, 417, (1983)）、Ｍｕファージ、（特開平２－１０９９８５号）または相同組換え（Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. (1972)）を用いた方法で宿主染色体に組み込むこともできる。

【００４０】

メチロフィラス属細菌で機能するベクターとしては、例えばメチロフィラス属細菌で自律複製出来るプラスミドが挙げられる。具体的には、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えばpAYC32（Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167）、あるいはpMFY42（gene, 44, 53(1990)）、pRP301、pTB70（Nature, 287, 396, (1980)）等が挙げられる。

【００４１】

また、メチロバチラス属細菌で機能するベクターとしては、例えばメチロバチラス属細菌で自律複製出来るプラスミドが挙げられる。具体的には、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えばpMFY42（gene, 44, 53(1990)）等が挙げられる。

【００４２】

一方、組換えDNA分子をメチロフィラス属細菌へ導入するには、十分な形質転換効率が得られる方法ならばいかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法(Canadian Journal of Microbiology, 43, 197, (1997))が挙げられる。

【００４３】

＜２＞Ｌ－メチオニン要求性が付与されたメタノール資化性細菌を用いたＬ－リ

ジンの生産

上記のようにして取得したmetA遺伝子破壊又は変異処理によりＬ－メチオニン要求性が付与され、かつＬ－リジン生産能を有するメタノール資化性細菌を、培地に適当量のＬ－メチオニンを添加して培養することにより、培養液中に著量のＬ－リジンが生成蓄積される。こうして、本発明のＬ－メチオニン要求性が付与されたメタノール資化性細菌を用いることは、Ｌ－リジンの蓄積量の向上に有効である。

【００４４】

Ｌ－リジン生産のために使用される培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養源を含有する通常の培地である。主要炭素源は、メタノールであるが、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、でんぷん加水分解物などの糖類、グリセロール、ソルビトールなどのアルコール類、フマール酸、クエン酸、コハク酸、ピルビン酸等の有機酸類を併用して用いることができる場合がある。「メタノールを主要炭素源とする」とは、全炭素源のうち、メタノールを50%(w/w)以上、好ましくは80%(w/w)以上であることをいう。メタノールを炭素源として用いる場合の濃度は、通常は0.001%から4%(w/v)、好ましくは0.1%から2%(w/v)である。また、グルコース等を添加する場合の濃度は、通常、0.1%から3%(w/v)、好ましくは0.1%から1%(w/v)である。

【００４５】

また、培地は、適当量のＬ－メチオニンを含有する必要がある。この含有量は、培養条件によりすることが好ましいが、通常は、Ｌ－メチオニンの含有量が十分でなく、細菌の生育が制限される含有量の内、その細菌により生産されるＬ－リジンが最も効率よく産生される含有量とされる。一例を挙げれば、培地中のＬ－メチオニン濃度は0.01g/Lから1g/Lが好ましい。

【００４６】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素源、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【００４７】

無機イオンとしては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。これらの他に、有機微量栄養源として、ビタミンB_1、または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい場合もある。

【００４８】

培養は、好気的条件下で１６～７２時間程度実施するのがよく、培養温度は２５℃～４５℃に、培養中ｐＨは５～８に制御する。尚、ｐＨ調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、あるいはアンモニアガス等を使用することができる。

【００４９】

培養終了後、発酵液からのＬ－リジンの採取は、通常のイオン交換樹脂法、沈澱法、その他の公知の方法を組み合わせることにより適宜実施できる。

【００５０】

【実施例】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明する。

【００５１】

【実施例１】メチロフィラス属細菌野生株からのＬ－メチオニン要求株の作製

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株（NCIMB 10515）の野生株に、以下に示すような手順で、ニトロソグアニジン（NTG）処理を行い、Ｌ－メチオニン要求株を分離した。まず、NTGの処理前日に、野生株 AS1 株を、50 mLのSEII培地（組成：K_2HPO_4 1.9g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 5.0g/L; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.56g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.72mg/L; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 5μg/L; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 25μg/L; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 23μg/L; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 9.7mg/L; メタノール 1%(v/v)）に植菌し、37℃で一晩振とう培養した。また、10 mg/mlの濃度となるようにNTG 溶液（ジメチルスルホキシド(DMSO) に溶解して作製）を調製しておいた。

【００５２】

翌日、培養した菌体を４℃で遠心により集菌し、その菌体に氷冷した50mlの 50mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)を加えて懸濁した後、再び遠心し、上清を除くことにより、菌体を一回洗浄した。菌体を2mlの同緩衝液にて懸濁し、これを

二つのエッペンドルフチューブに等分した。その内の一本はNTG処理用で、もう一本はNTG非処理の対照物として用いた。各チューブに、10μlのNTG溶液、またはNTGを含まないDMSO溶液を添加した。ここで、NTG処理したサンプルでは、NTGの最終濃度は0.1 mg/mLとなっている。これらのサンプルを37℃で５分間処理し、氷上で２分間放置した後、各サンプルを15000rpm、2分間の遠心にかけて集菌した。

【００５３】

集めたそれぞれの菌体は、氷冷したSEII培地で２回洗った後、3 mlのSEII+MT培地（組成：SEII培地にＬ－メチオニン(1g/L)とＬ－スレオニン(10g/L)を含む培地）に懸濁し、37℃で一晩培養した。なお、この時、それぞれのサンプルの一部を抜き取り、SEII寒天培地（組成：SEII培地に寒天1.5%(w/v)を含む）上にまき、形成されたコロニー数（生菌数）から、NTG処理操作による菌の死滅率を算出した。死滅率は、[NTG処理をしたサンプルでの生菌数／DMSO溶液のみの処理をしたサンプルでの生菌数]で表した。

【００５４】

NTG処理の翌日、前記培養液の一部を、SEII+MT培地に植菌し、37℃で培養して菌を増殖させた。その培養液の、660nm波長での吸光度(OD660nm)の値が約0.5になったところで、菌体を保存するために、20%のDMSO溶液を等量加え（終濃度10%）、十分に撹拌した後に、-80℃に保存した。

【００５５】

また、培養液の一部をSEII-MT寒天培地と、抗生物質のストレプトマイシン(Sm)50μg/mlを含むSE-II寒天培地とにまき、Sm耐性菌株の出現頻度、すなわち変異率を測定した。その結果、変異率は約４×10^{-6}であった。

【００５６】

NTG処理した菌の保存溶液を室温で溶かし、1～1/10^{7}の希釈系列を作り、それらをSEII-MT寒天培地にまいた。37℃で２日間培養し、一枚の寒天プレート当り100～200個のコロニーを形成する希釈の程度を確認した。そして、その濃度になるように、菌の保存液を改めて希釈しSEII+MT寒天培地にまいた。37℃で３日間の培養後、出現したコロニーをそれぞれSEII寒天培地プレートとSEII+MT寒天培

地プレートにレプリカし、SEII+MT寒天培地では生育するが、SEII寒天培地では生育できないコロニーを選択した。次に、その選択したコロニーを更に順次、SEII寒天培地、 SEII+M寒天培地（組成：SEII培地にＬ－メチオニン(1g/L)を含む寒天培地）、SEII+T寒天培地（組成：SEII培地にＬ－スレオニン(10g/L)を含む寒天培地）、及び、SEII+MT寒天培地のそれぞれに植菌し、それらのクローンのアミノ酸要求性が、Ｌ－メチオニンかＬ－スレオニンのいずれか、あるいは両方の要求性であるのかを確認した。

【００５７】

その結果、２株のＬ－メチオニン要求株と１株のＬ－スレオニン要求株を取得できた。それぞれ、MR102株、MR103株、及びTR212株と命名した。なお、生育するのに同時に両方のアミノ酸を要求する変異株は、今回は取得できなかった。

【００５８】

【実施例２】

＜１＞ブレビバクテリウム属細菌由来のlysE遺伝子のメチロフィラス属細菌への導入

（１）pRSlysE24の構築

メチロフィラス属細菌に、コリネバクテリウム・グルタミカムにおいてリジンの排出活性を発揮する蛋白質をコードするlysE遺伝子を導入するために、公知のプラスミドpRS（特表平3-501682号公報参照）を用いて、lysE発現用プラスミドpRSlysEを構築した。pRSは、RSF1010の誘導体である広宿主域ベクタープラスミドpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167)に由来するpVIC40プラスミド（WO90/04636国際公開パンフレット、特表平3-501682号公報）より、同プラスミドが持つスレオニンオペロンをコードするDNA領域を削除してベクター部分のみを持つプラスミドである。

【００５９】

まず、pRSより、tacプロモーターを持つプラスミドpRStacを構築した。pRSベクターを制限酵素EcoRIおよびPstIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約8キロベース

ペア（以下、「kbp」と記載）のDNA断片をEASY TRAP Ver.2（DNA回収キット、宝酒造社製）を用いて回収した。一方、tacプロモーター領域を、pRK223-3プラスミド（発現用ベクター、Pharmacia社製）を鋳型とし、配列番号１および２に示すプライマーを用いて、PCRにより増幅した（変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-60秒のサイクルを30サイクル行った）。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase（宝酒造社製）を使用した。増幅されたtacプロモーターを含むDNA断片をPCRprep（Promega社製）にて精製した後、あらかじめ、プライマーDNAの配列中にデザインしておいた制限酵素サイト、すなわちEcoRIおよびEcoT22Iで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収した後、0.8%アガロースゲルにて分離し、約0.15kbpのDNA断片をEASY TRAP Ver.2を用いて回収した。

【００６０】

上記のように調製したpRSベクター消化物と、tacプロモーター領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造製）を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ（E.coli JM109 competent cells、宝酒造製）を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ－SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で消化して構造を確認し、pRStacを得た。そしてpRSベクター上のストレプトマイシン耐性遺伝子の転写方向とtacプロモーターの転写方向が同じ向きになっているものを、pRStacとして選択した。

【００６１】

上記のようにして得たpRStacを、Sse8387I（宝酒造製）およびSapI（ニューイングランドバイオラボ社製）で消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し、約9.0kbpのDNA断片を回収した。

【００６２】

また、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム２２５６株（コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13869）より抽出した染色体を鋳型として、配列番号５および６に示すプライマーを用いたPCR法（変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-90秒）によりlysE遺伝子断片を増幅した。PCR反応には、Pyrobest DNA polymerase（宝酒造社製）を使用した。このとき、lysE遺伝子がメチロフィラス属細菌中で発現可能となるように、lysE遺伝子の翻訳開始コドンより9～15bp塩基を、メチロフィラス属細菌で機能することがわかっている配列（Wyborn, N. R., Mills, J., Williamis, S. G. and Jones, C.W., Eur.J.Biochem., 240, 314-322(1996)）に変更するようにプライマーDNAの塩基配列を設計した。得られた断片をPCRprep（Promega社製）にて精製した後、制限酵素Sse8387IおよびSapIで消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収し、0.8%アガロースゲルで回収した。

【００６３】

上記のように調製したpRStacベクター消化物と、lysE遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造製）を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ（E.coli JM109 competent cells、宝酒造製）を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリ－SDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSlysEを得た。pRSlysEは、tacプロモーターの転写方向に対して、lysE遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

【００６４】

（２）メチロフィラス属細菌へのpRSlysEの導入

上記のようにして得られたpRSlysEを、エレクトロポレーション法（Canadian Journal of Microbiology, 43. 197 (1997)）によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株（NCIMB10515）に導入した。なお、対照として、pRSをpRSlysEと同様にしてAS1株に導入した。その結果、対照として用いたpRSでは1mgのDNAあた

り数千個のコロニーを得たが、それに対してpRSlysEでは数個のコロニーしか得られなかった。

【００６５】

pRSlysEが導入されたと思われる形質転換株よりプラスミドを抽出して塩基配列を調べたところ、調べたすべてのプラスミドにおいて、lysEをコードする領域内に自然変異が導入され、それらの変異のうちいくつかは、アミノ酸をコードするコドンが翻訳を停止させる停止コドンに置き換わるナンセンス変異が導入されていた。また、別のプラスミドではlysE遺伝子に欠失がみられた。これらのプラスミドに搭載されているlysEは、いずれも、機能が失われていることが考えられた。

【００６６】

以上のように、全長のlysE遺伝子を搭載するpRSlysEのメチロフィラス・メチロトロファスへの導入頻度は極めて低く、また機能を失わせるような変異が導入されたlysE変異遺伝子を持つプラスミドのみが導入できたことと併せて考えると、メチロフィラス・メチロトロファスにlysE遺伝子を導入することは致死的であると考えられた。このことは、lysE遺伝子が異種の細菌においてＬ－リジンの排出に関して万能に機能するものではないことを示している。

【００６７】

変異が導入されたpRSlysEを持つメチロフィラス・メチロトロファスAS1株を、20mg/Lのストレプトマイシンを含むSEIIプレートに塗り広げ、３７℃にて１晩培養したのち、培地表面約0.3cm２の菌体をかきとって２０mg/Lのストレプトマイシンを含むSEII生産培地(20ml)に植菌し、37℃にて34時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるＬ－リジン濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。その結果、変異型lysE遺伝子が導入されてもＬ－リジンの排出が促進されたと思われる株はほとんど得られなかった。

【００６８】

＜２＞メチロフィラス属細菌でＬ－リジン排出活性を示す遺伝子の取得

上記で述べたように、既知のlysE遺伝子はメチロフィラス属細菌中では致死的

であることが示唆され、機能が失われたような変異型遺伝子が多く得られた。

【００６９】

しかしながら、変異が導入されたpRSlysEの解析を行ううちに、メチロフィラス属細菌中で機能する変異型lysE遺伝子を偶然に取得することができた。

【００７０】

この変異型lysE遺伝子をlysE24遺伝子と命名した。lysE24遺伝子の塩基配列を解析したところ、この変異は、アミノ酸置換が起こる変異ではなく、lysEの翻訳領域内のほぼ中央に終止コドンが導入されるナンセンス変異であることがわかった。lysE24では、配列番号１７の355位のG（グアニン）のあとにT（チミン）が挿入されていた。そしてこの発現プラスミドをpRSlysE24と命名した。

【００７１】

pRSlysE24で形質転換されたE.coli JM109株はAJ13830と命名され、同株は2001年6月4日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18369として寄託され、平成14年5月13日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-8040の受託番号のもとで、寄託されている。

【実施例３】リジン生産プラスミドpSEA10とpSEA12の構築

＜１＞dapA*遺伝子を持つプラスミドpRSdapAの構築

次に、Ｌ－リジン生合成系酵素遺伝子として、Ｌ－リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子（dapA*）を持つプラスミドを作製した。

【００７２】

実施例２で作製したpRStacを制限酵素Sse8387IおよびXbaIで消化し、フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収しエタノール沈殿にてDNAを回収後、0.8%アガロースゲルで分離し約9kbpのDNA断片を回収した。

【００７３】

dapA*遺伝子断片は、同遺伝子を含む公知のプラスミドRSFD80(WO90/16042号参照)を鋳型として、配列番号３および４に示すプライマーDNAを用いたPCR法（変性94℃-20秒、アニーリング55℃-30秒、伸長反応72℃-60秒）により増幅した。P

CR反応には、Pyrobest DNA polymerase（宝酒造社製）を使用した。得られたdapA*断片をPCRprep（Promega社製）にて精製した後、制限酵素Sse8387IおよびXbaIで消化した。フェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後、上層を回収し、エタノール沈殿にてDNAを回収し、0.8%アガロースゲルで分離後、約0.1kbpのDNA断片を回収した。

【００７４】

上記のように調製したpRStacベクター消化物と、dapA*遺伝子領域断片を、DNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造製）を用いて連結させた。この連結反応溶液でエシェリヒア・コリ（E.coli JM109 competent cells、宝酒造社）を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩保温した。寒天培地上に出現したコロニーを、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地に接種し、37℃で8時間振盪培養した。アルカリーSDS法にて各培養液からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pRSdapAプラスミドを得た。pRSdapAプラスミドは、tacプロモーターの転写方向に対して、dapA*遺伝子の転写方向が同じ向きになるように配置されている。

【００７５】

pRSdapAプラスミドで形質転換されたE.coli JM109株はAJ13831と命名され、同株は2001年６月４日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM P-18370として寄託され、平成１４年５月１３日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-8041の受託番号のもとで寄託されている。

【００７６】

＜２＞lysE24及びdapA*を持つプラスミドpSEA10とpSEA12の構築

lysE24とdapA*の組み合わせ効果を評価するために、pRSlysE24プラスミドにdapA*遺伝子を挿入したプラスミドを構築した。実施例２で作製したpRSlysE24を制限酵素SapIで消化し、DNA Blunting Kit（宝酒造社製）にて末端を平滑化した。また、dapA*を持つプラスミドpRSdapAを制限酵素EcoRIおよびSapIで消化し、0.8%アガロースゲルにより約1kbpのtacプロモーターおよびdapA*領域を含む断片を

分離し、同断片をEASY TRAP Ver2(宝酒造製)にて回収した。この断片を前記と同様に平滑化し、前記のpRSlysE24の消化物とDNA Ligation Kit Ver2(宝酒造製)にて連結した。

【００７７】

上記の連結反応溶液でエシェリヒア・コリ（E.coli JM109 competent cells、宝酒造社製）を形質転換し、20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に塗布した。37℃で一晩、その寒天プレートを保温したところ、寒天培地上に多数のコロニーが出現した。その内、８コロニーを20mg/Lのストレプトマイシンを含むLB液体培地にそれぞれ接種し、37℃で8時間振盪培養した。各培養液からアルカリーSDS法にてプラスミドDNAを抽出し、制限酵素での消化および塩基配列の決定により構造を確認して、pSEA10とpSEA12プラスミドを得た。これらのプラスミドは、lysE24とdapA*の各遺伝子の転写の向きが、互いに向かい合うようになっているのが前者で、同一方向になるように配置されているのは後者である。

【００７８】

【実施例４】メチロフィラス・メチロトロファスAS1株及びＬ－メチオニン要求株（MR102株、MR103株）へのpSEA12の導入（リジン生産へのＬ－メチオニン要求性賦与の効果）

メチロフィラス・メチロトロファス野生株AS1株及び２つのＬ－メチオニン要求株MR102株とMR103株への遺伝子搭載プラスミドの導入は、接合伝達法により行った。接合実験をする前日に、受容菌として、AS1株、MR102株そしてMR103株を、各々15mLのSEII+M培地（組成：Ｌ－メチオニン0.5g/Lを含むSEII培地）で培養した。モービライザーとして、pRK2013を保持するE. coli HB101株を10 mLのLB(Km)培地（カナマイシン25μg/mlを含むLB培地）に、そして、供与菌としてpSEA12を保持するE. coli JM109株を3mLのLB(Sm)培地（ストレプトマイシン20μg/mlを含むLB培地）に各々植菌し、培養を行った。

【００７９】

翌日、各培養液を遠心し、集菌後、pRK2013を保持するE. coli HB101株とpSEA12を保持するE. coli JM109株についてはLB培地にて、菌体を一度洗浄した。また上記のメタノール資化性細菌３株も集菌後にSEII培地で洗浄した。次に、それ

ぞれのE. coli菌体はLB培地に懸濁し、メタノール資化性菌はSEII培地に懸濁した。そうして、それらの懸濁液の適当量を、LB寒天培地上でエーゼを用いて混合し、37℃で4時間保温し、pSEA12を、それぞれAS1株、MR102株、及びMR103株へ接合伝達させた。その後、その寒天培地上から、それぞれの菌体をかきとり、SEII+M(Sm)寒天培地（培地組成：Sm（50μg/ml）を含むSEII+M寒天培地）に塗り広げ、37℃で２日間培養することで、形質転換体を選択した。そこに出現したシングルコロニーは、更に２回、新しいSEII+M(Sm)寒天培地へ広げ、目的株としてのMR102(pSEA12)株及びMR103(pSEA12)株、及び対照株であるAS1(pSEA12)を、それぞれ単離した。

【００８０】

上記の３株を、SEII+M(Sm)寒天培地へ塗り広げ、３７℃にて１晩培養した後、培地表面に生育した約3cm^2（平方センチメートル）の面積の菌体をかきとって、種々の濃度でＬ－メチオニンを含むSEII生産培地(20ml)に植菌し、37℃にて34時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるＬ－リジン濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。その結果、AS1(pSEA12)株は培地中へのＬ－リジン蓄積が最高で0.96g/Lであったのに対して、MR102株及びMR103株のpSEA12導入株は、Ｌ－メチオニンを生産培地へ0.075 g/Lで添加した際に、培地中のＬ－リジン蓄積は、それぞれ1.675g/L、1.57g/Lと大幅な向上を示した。

【００８１】

【実施例５】メチロフィラス・メチロトロファスAS1株からのＬ－メチオニン要求株(MR701株)の作製と、同株へのpSEA10の導入によるリジン生産菌の作製

＜１＞metA遺伝子破壊株の作製

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株から、遺伝子破壊によるＬ－メチオニン要求株の取得のための遺伝子破壊用断片を作製した。破壊する遺伝子には、homoserine o-acetyltransferase（ホモセリンo-アセチルトランスフェラーゼ）をコードしていると考えられるマイコバクテリウム・ツベルクローシス（Mycobacterium tuberclosis）H37Rv株のmetA遺伝子（GenBank accession No.CAA17113）と高いホモロジーを示した遺伝子領域を選んだ。なお、この領域は、配列番号

７と１０に記載のDNAプライマーを用いたPCR（反応条件：TaKaRa Ex Taqを用い、変性工程：94℃で30秒間、アニーリング工程：60℃で30秒間、DNA鎖伸長反応工程：72℃で4分間の反応工程を25サイクル）にて増幅が可能であり、その領域のDNA配列とそれがコードするアミノ酸配列を配列表配列番号１５と１６に示し、metA遺伝子と命名した。

【００８２】

野生株AS1株から染色体DNAを取得することを目的に、AS1株を50mLのSEII培地（組成：$(NH_4)_2SO_4$ 5g/L, K_2HPO_4 1.9g/L, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.56g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 200mg/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 72mg/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 5μg/L, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 25μg/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 23μg/L, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 9.7mg/L, メタノール 0.5%(v/v)）に植菌し、培養温度37℃にて一晩振とう培養した。その後、培養液を遠心し、菌体を回収後、市販のキット（Genomic DNA purification kit（Edge Biosystems社製）にて、染色体DNAを調製した。

【００８３】

この染色体DNAを鋳型にして、配列番号７と８に記載のDNAプライマーを用いて、PCR（反応条件：宝酒造社製 TaKaRa Ex Taqを用い、変性工程：94℃で30秒間、アニーリング工程：60℃で30秒間、DNA鎖伸長反応工程：72℃で2分間の反応工程を25サイクル）を行い、約1.3kbの断片を得た。また同様の条件にて配列番号９と１０に記載のプライマーを用いたPCRを行い、約2.0kbの大きさのDNA断片を得た。

【００８４】

一方、プラスミドpKD4（GenBank Accession No. AY048743, Datsenko, K.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97 (12), 6640-6645, 2000）を鋳型として、上記と同じ条件にて配列番号１１と１２を用いてPCRを行い、カナマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片(約1.5kb)を調製した。

【００８５】

以上の３種のDNA断片を混ぜ合わせ、これを鋳型に配列番号１３と14に記載したプライマーを用いてPCR（反応条件：TaKaRa Ex Taqを用い、変性工程：94℃で30秒間、アニーリング工程：60℃で30秒間、DNA鎖伸長反応工程：72℃で4分30秒

間の反応工程を25サイクル）を行い、約4.2kbの断片を取得した。この断片を市販のキット（Promega社製　Wizard PCR Preps DNA Purification System）を用いて精製後、エタノール沈殿操作を行い、沈殿をTEに懸濁した。このDNA溶液を遺伝子破壊用断片として以下の操作に用いた。尚、同遺伝子断片は、metA遺伝子の内部にカナマイシン耐性遺伝子が挿入された構造を有している。

【００８６】

次に、メチロフィラス・メチロトロファスAS1株に、上記で記載した遺伝子断片の導入を行った。形質転換は、エレクトロポレーション法（Canadian Journal of Microbiology, 43. 197 (1997)）を用いた。エレクトロポレーション後の菌体をSEII寒天培地（カナマイシン 20mg/L、Ｌ－メチオニン 0.5g/L添加）に塗布後、培養48時間目に数十コロニーが出現し、そのうち13株を無作為に選択しＬ－メチオニン要求性を調べたところ、全ての株がＬ－メチオニン要求性を示した。遺伝子破壊によって取得したＬ－メチオニン要求株をMR701株と命名した。

【００８７】

目的どおりの遺伝子が破壊されていることは、PCR法により確認した。即ち、滅菌水20μlに、上記の出現したコロニーを懸濁し、1mg/ml Proteinase Kを5μl、緩衝液（40mM Tris、0.5% Tween20、1% Nonidet P-40、1mM EDTA（HClにてpH8.0に調整））を25μl添加後、60℃で20分、及び95℃で5分反応させた。この反応液をPCR反応の鋳型として用いた。そして、配列番号１と４をプライマーとして用いたPCR（反応条件：TaKaRa Ex Taqを用い、変性工程：94℃で30秒間、アニーリング工程：60℃で30秒間、DNA鎖伸長反応工程：72℃で4分30秒間の反応工程を25サイクル）を行うことによって、目的の遺伝子が破壊されていることを確認した。

【００８８】

＜２＞metA遺伝子破壊株のＬ－リジン生産性の評価

次に、実施例３に記載したpSEA10を上記のようにして取得したMR701株に導入し、Ｌ－リジン生産性を調べた。エレクトロポレーションによりMR701株にpSEA10を導入し、得られた形質転換体をMR701(pSEA10)と命名した。AS1(pSEA10)株をSEII(Sm)（ストレプトマイシン50μg/mlを含むSEII培地）寒天培地に、MR701(pSE

A10)株をSEII+M(Sm)（Ｌ－メチオニン0.5g/L及びストレプトマイシン50μg/mlを含むSEII培地）寒天培地に塗り広げ、37℃にて１晩培養したのち、培地表面の約３cm^2(平方センチメートル)の広さで、生育している菌体をかきとって、Ｌ－メチオニン0.075g/Lを含むSEII生産培地（ストレプトマイシン50μg/ml添加）20mlに植菌し、37℃にて48時間振盪培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるＬ－リジン濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。その結果、AS1(pSEA10)株は培地中へのＬ－リジン蓄積が0.97g/Lであったが、MR701(pSEA10)株は、培地中にＬ－リジンを1.52g/L蓄積することがわかり、Ｌ－メチオニン要求性付与により、Ｌ－リジンの生産性が向上することが確認できた。

【００８９】

〔配列表の説明〕

配列番号１：tacプロモーター領域増幅用プライマー

配列番号２：tacプロモーター領域増幅用プライマー

配列番号３：dapA*遺伝子増幅用プライマー

配列番号４：dapA*遺伝子増幅用プライマー

配列番号５：lysE遺伝子増幅用プライマー

配列番号６：lysE遺伝子増幅用プライマー

配列番号７：metA遺伝子増幅用プライマー

配列番号８：metA遺伝子増幅用プライマー

配列番号９：metA遺伝子増幅用プライマー

配列番号10：metA遺伝子増幅用プライマー

配列番号11：カナマイシン耐性遺伝子増幅用プライマー

配列番号12：カナマイシン耐性遺伝子増幅用プライマー

配列番号13：metA遺伝子破壊用断片増幅用プライマー

配列番号14：metA遺伝子破壊用断片増幅用プライマー

配列番号15：metAの塩基配列

配列番号16：metAによりコードされるアミノ酸配列

配列番号17：lysEの塩基配列

配列番号18：lysEによりコードされるアミノ酸配列

【００９０】

【発明の効果】

本発明により、メタノール資化性細菌のＬ－リジン生産性を向上させることができる。

【００９１】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co. Inc.

<120> メタノール資化性細菌を用いたＬ－リジンの製造法

<130> P-B0647

<140>

<141> 2003-01-29

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 1

agggaattcc ccgttctgga taatgttttt tgcgccgac　39

<210> 2

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 2

cggatgcatc tagagttaac ctgcagggtg aaattgttat ccgctcacaa ttccacac　58

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 3

tgacctgcag gtttgcacag aggatggccc atgtt　35

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 4

cattctagat ccctaaactt tacagcaaac cggcat　　36

<210> 5

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

catttcctgc aggcaaagga gatgagcgta atggtgatca tggaaatctt cattacaggt 60

ctgc　　64

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

gggcgagcta gaagagctcc aaaacccgcg aaaactaacc catcaacatc　50

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7
tgagtgcaaa tttgacctca tcgtcagcaa　30

<210> 8
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8
ccagcctaca caatcgctca agacgtgtaa tgcaaggttt cataagcaag atggtattgt 60
ggca　64

<210> 9
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9

ggctaattcc catgtcagcc gttaagtgtt gcagataacg ccttgcccgt caaatatgcc 60

gag 63

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 10

acaggctgtt ccatgcctct gcagagggcg 30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 11

gcattacacg tcttgagcga ttgtgtaggc 30

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12

ggaacactta acggctgaca tgggaattag cc　　32

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13

atgacccaca cttgcaacaa ggcgatttgc　　30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14

gaaggggttg ccttgtttga tgccactggc　　30

<210> 15

<211> 4310

<212> DNA

<213> Methylophilus methylotrophus

<220>

<221> CDS

<222> (1236)..(2363)

<400> 15

tgagtgcaaa tttgacctca tcgtcagcaa cccgccttat atcgaaggca atgacccaca 60

cttgcaacaa ggcgatttgc gcttcgaacc tttatcagcc ctggcatccg gtgctgatgg 120

tctgcaagat atccgccaga tcattgccca ggcacccgcc tacttaaatg aaggggggctg 180

gttgatgctg gaacatggtt acaaccaagc tccagcagtc caaaaattat tgaacgcaca 240

tggttttcaa gacatccaaa ccatcaagga tctgggcgat aatcctcgcg tcacccttgg 300

acaaataggc agcaccaacc cagtatgatt tttgcttgag taaagatacg ttagtctcaa 360

gtatcatttt ctggaaaaaa cattatgcaa tctatcccac atatcaaagc cgttttattt 420

gacctggatg gcgtgctcta catcggcaaa cagctgattc ccggcgcatt gtccgctgtg 480

gcacagttgc gcaaagcagg gattgccgtg cgctttgtca ccaataccag cacactttcc 540

ctaaactcac tccagcaaaa gctgaacgac ctcggcttca atacggtgcc cgaagaaatc 600

atgagtgcac cacaagcgac catccagtat ttaaaaaagc aatccaatcc ggtttgcaaa 660

ctattgctgg cagaggacgt taaaaaggac tttgcctgct ttgaccagtc tgcaaccgca 720

gccaattatg tggtgattgg tgatatcggt gaccagtggt cttatgagtt attgaatgaa 780

gtgtttcatt gcctggtgaa tggtgctcag ttaatcgcga ttcataaaaa ccgtttctgg 840
caaaccgaaa ctggcttgca aatggatatt ggtgcctttg ttaccggcct ggaatatgcc 900
agcaacaccc aggccatgct catgggtaaa ccttcccgcc atttttttcaa tcaggtggtg 960
gatacattac ggatgaagcc ttctgatatc gtgatggtgg gtgacgatat tgatgccgat 1020
gtgggtggcg cgcaggatgc tggactgcat ggcattctgg tgaaaaccgg caagtaccgc 1080
gaaacctata cccgcctttc agcgattgag ccagatgcga ttatccaatc cgtcgcagac 1140
cttcccacgt tgctgggttg tttatcgatt cagacccatt aaacgcaact tagcctgtct 1200
cgccgtttcg gcatgctgca tagtataatc gcggc atg tct gaa tcg aat tct 1253
Met Ser Glu Ser Asn Ser
1 5
gtt ggt atc gtt aaa gcg cag gtt gcg cac ttc acc cag ccg ctg acc 1301
Val Gly Ile Val Lys Ala Gln Val Ala His Phe Thr Gln Pro Leu Thr
10 15 20
ctt aaa agc ggc gct gtg ttg cca caa tac cat ctt gct tat gaa acc 1349
Leu Lys Ser Gly Ala Val Leu Pro Gln Tyr His Leu Ala Tyr Glu Thr
25 30 35
tat ggt gaa ctc aac gcg gcc aaa acc aat gcg gta ttg att tgt cac 1397
Tyr Gly Glu Leu Asn Ala Ala Lys Thr Asn Ala Val Leu Ile Cys His
40 45 50
gcc ttg tcc ggc aat cat cat gtc gct ggt cgc tat tcg ccg gaa gat 1445
Ala Leu Ser Gly Asn His His Val Ala Gly Arg Tyr Ser Pro Glu Asp
55 60 65 70
aaa tat cct ggc tgg tgg gat aac ctt gtt ggc ccc ggt aag cca ctg 1493
Lys Tyr Pro Gly Trp Trp Asp Asn Leu Val Gly Pro Gly Lys Pro Leu
75 80 85
gat acc aac aag ttt ttt gtg att ggc ctc aac aat ctg ggc ggc tgt 1541
Asp Thr Asn Lys Phe Phe Val Ile Gly Leu Asn Asn Leu Gly Gly Cys
90 95 100
cac ggt agt agc ggc cct tcc agc gta aat cca ctc act gac cgg cct 1589

His Gly Ser Ser Gly Pro Ser Ser Val Asn Pro Leu Thr Asp Arg Pro
105 110 115

tac agt gca acg ttc cca gtc gtg acg gta gaa gac tgg gtg gaa tct 1637
Tyr Ser Ala Thr Phe Pro Val Val Thr Val Glu Asp Trp Val Glu Ser
120 125 130

cag gcg cgc ctg ttg gat tat ctt gga att gac caa ctg gca gcc gtg 1685
Gln Ala Arg Leu Leu Asp Tyr Leu Gly Ile Asp Gln Leu Ala Ala Val
135 140 145 150

att ggt ggc agc ctg gga ggc atg caa gcg ctg cac tgg aat att gtc 1733
Ile Gly Gly Ser Leu Gly Gly Met Gln Ala Leu His Trp Asn Ile Val
155 160 165

tac ccc gag cgt gta cgg cat gcc ttt gtc att gcc tct gcg ccc aac 1781
Tyr Pro Glu Arg Val Arg His Ala Phe Val Ile Ala Ser Ala Pro Asn
170 175 180

ctg acc gca cag aac atg gcc ttt aac gaa gtg gca cgc cag gcg att 1829
Leu Thr Ala Gln Asn Met Ala Phe Asn Glu Val Ala Arg Gln Ala Ile
185 190 195

att acc gac ccc gag ttt ttt gac ggc gat tat tat aat cat ggc acc 1877
Ile Thr Asp Pro Glu Phe Phe Asp Gly Asp Tyr Tyr Asn His Gly Thr
200 205 210

gtc ccc cgc cgc ggc ttg cgt att gcc cgt atg ctg ggg cat atc acc 1925
Val Pro Arg Arg Gly Leu Arg Ile Ala Arg Met Leu Gly His Ile Thr
215 220 225 230

tac ttg tca gat gac gcc atg ggt gaa aaa ttt ggc cgc aaa ttg cgc 1973
Tyr Leu Ser Asp Asp Ala Met Gly Glu Lys Phe Gly Arg Lys Leu Arg
235 240 245

cat ggc gat gtg aag tac agc ttt gat gtc gaa ttt gaa atg gaa tct 2021
His Gly Asp Val Lys Tyr Ser Phe Asp Val Glu Phe Glu Met Glu Ser
250 255 260

tac ttg cgc tat cag ggc gac aag ttt gcc ggg gaa ttt gat gcc aac 2069
Tyr Leu Arg Tyr Gln Gly Asp Lys Phe Ala Gly Glu Phe Asp Ala Asn
265 270 275

acc tat ttg cgc atg aca cgc gca ctg gac tat ttt gac ccg gcc ctc 2117
Thr Tyr Leu Arg Met Thr Arg Ala Leu Asp Tyr Phe Asp Pro Ala Leu
280 285 290

gat tat gac ggc aat tta agc aag gcg ctc agc cgt gcc aag gcc aag 2165
Asp Tyr Asp Gly Asn Leu Ser Lys Ala Leu Ser Arg Ala Lys Ala Lys
295 300 305 310

ttt gtc gtc atc tcg ttt acc act gac tgg cgc ttt tcg cct gcc cgc 2213
Phe Val Val Ile Ser Phe Thr Thr Asp Trp Arg Phe Ser Pro Ala Arg
315 320 325

tca cgc gaa att gtc cag gcc ttg ctg gat aac gcc ttg ccc gtc aaa 2261
Ser Arg Glu Ile Val Gln Ala Leu Leu Asp Asn Ala Leu Pro Val Lys
330 335 340

tat gcc gag gta act tct gcc cat ggc cat gac gct ttc ttg atg ccg 2309
Tyr Ala Glu Val Thr Ser Ala His Gly His Asp Ala Phe Leu Met Pro
345 350 355

gat gcg cat tac cac gcc atc atg cgc gcc tac ctg gag caa atc aaa 2357
Asp Ala His Tyr His Ala Ile Met Arg Ala Tyr Leu Glu Gln Ile Lys
360 365 370

gta tga cgaatgcaaa tattaccaat attcgcccag actttgcatt aattacaaac 2413
Val
375

tgggtgcaag caaaagccaa agtgctggat ctcggttgtg gcgatggcac actgctcacg 2473
catttacatg aaaccctgag caccaccggc tatggcatcg aaaaagatga tggtaactgg 2533
ctggcagcct taaaaaacgg ggtggacgtg attcaaatga accttgaaga aggcctgtcc 2593
ggctttgaag accagtcatt cgacacggtc atcctgtcgc agactttgca agccatgcac 2653
aatactgaga gcatcgtgca cgaaatgctg cgtgttggcc gcgaaatcat cgtgactttc 2713

cccaattttg gctattggcg caaccgcctg caaatcacgc tggggaatat gccggtctcc 2773
aaaagcctgc catatcaatg gtatgacacg cccaacgtgc atttatgcac catccacgac 2833
tttgaccact tttgccgcca gcacaacatt caagtcattg aacgtaaagt gattaccgat 2893
ggccaggata ttcatttttt gcctaacctg ctgggcaatc tcgcaatgta ccggttgaaa 2953
cgcgccgcct aatcccgaca agagaccaaa gggtgccctt aagaaagatt gagcgctttc 3013
aggcgccggt aaagcgtatt tcggcttaac cccaactgac gggaaacggc cgaaatattg 3073
ccgccatgct gcagcatggc ctgccggatg gcttcatcgt tttgggcttt caagttgccg 3133
gctgctaacg ctggccgtgc agaaccgacg ggtgtagaag gttcgctgat ggggtacatt 3193
tcatcgagaa agtcctgcat caaatgctgg cggccaatca cgccgccatc tgccaaggcc 3253
acggccgtgc gcaacacatt atgcaactgg cgtacattgc ccggccaagg atgcgcatta 3313
aacagtgcca tgacctcatc acttaagctg gcttgtggcg cctgttcgat ttgcagaatc 3373
acctgaatca gccttgccat atccagccgc tcgcgtagcg caggtaactg cacactcaag 3433
ccattgatgc ggtaatatag atcactgcga aactcgcccg ctgccacttt gtcttttaac 3493
ttctgattcg tcgcgctcag cagcataaag ttgaccggaa tcgccttgct gcctcccaac 3553
ggggtgacac tgcgctcttg cagcacgcgt aacaagcgtg cttgtagcga cagcggcata 3613
tcgccaatct catccaagaa caaggtgccg ccatccgctt gctgaatctt gccaatattg 3673
cctttgcgtt tcgccccggt gtacgcgccc tcctcatagc caaacagttc ggcttcaatc 3733
agcccttctg gcaaggccgc acagttgacg gcaataaacg gcttgttgcg gcgcgcactg 3793
gcgtcatgaa tggcacggga aaataattct ttacccgcgc cggtttcgcc gagaatcagc 3853
accggaatgt ccttatccag cacttgtttg acctgggtga tcgccaattt aaattggggg 3913
tcaccactat cgagcagctc caggctggcc gcagattcgc gtggcgtcat cgccactggc 3973
tttttggcga tagtggctgg ctggctggtc gatgcacgcg caaacaaacg ggcgccattg 4033
cgcagatgca agggaaatag gacatcagca tttaaaccgc gctgcttgaa cgaggcccat 4093
gactcgtcaa aaatgtcttc aaaagcaata cggcgcgcag acagactatc ctggtccagc 4153
ggcaaaccaa actggaactg gccgctacgg ttaatggcct gcaactggcc agtggcatca 4213
aacaaggcaa ccccttccca taaagtgcca ataaactctg gccgcacatg aaagtgcaca 4273
ccaatctcgc cctctgcaga ggcatggaac agcctgt 4310

<210> 16

<211> 375

<212> PRT

<213> Methylophilus methylotrophus

<400> 16

Met Ser Glu Ser Asn Ser Val Gly Ile Val Lys Ala Gln Val Ala His
1 5 10 15

Phe Thr Gln Pro Leu Thr Leu Lys Ser Gly Ala Val Leu Pro Gln Tyr
20 25 30

His Leu Ala Tyr Glu Thr Tyr Gly Glu Leu Asn Ala Ala Lys Thr Asn
35 40 45

Ala Val Leu Ile Cys His Ala Leu Ser Gly Asn His His Val Ala Gly
50 55 60

Arg Tyr Ser Pro Glu Asp Lys Tyr Pro Gly Trp Trp Asp Asn Leu Val
65 70 75 80

Gly Pro Gly Lys Pro Leu Asp Thr Asn Lys Phe Phe Val Ile Gly Leu
85 90 95

Asn Asn Leu Gly Gly Cys His Gly Ser Ser Gly Pro Ser Ser Val Asn
100 105 110

Pro Leu Thr Asp Arg Pro Tyr Ser Ala Thr Phe Pro Val Val Thr Val
115 120 125

Glu Asp Trp Val Glu Ser Gln Ala Arg Leu Leu Asp Tyr Leu Gly Ile
130 135 140

Asp Gln Leu Ala Ala Val Ile Gly Gly Ser Leu Gly Gly Met Gln Ala
145 150 155 160

Leu His Trp Asn Ile Val Tyr Pro Glu Arg Val Arg His Ala Phe Val
165 170 175

Ile Ala Ser Ala Pro Asn Leu Thr Ala Gln Asn Met Ala Phe Asn Glu
180 185 190

Val Ala Arg Gln Ala Ile Ile Thr Asp Pro Glu Phe Phe Asp Gly Asp
195 200 205
Tyr Tyr Asn His Gly Thr Val Pro Arg Arg Gly Leu Arg Ile Ala Arg
210 215 220
Met Leu Gly His Ile Thr Tyr Leu Ser Asp Asp Ala Met Gly Glu Lys
225 230 235 240
Phe Gly Arg Lys Leu Arg His Gly Asp Val Lys Tyr Ser Phe Asp Val
245 250 255
Glu Phe Glu Met Glu Ser Tyr Leu Arg Tyr Gln Gly Asp Lys Phe Ala
260 265 270
Gly Glu Phe Asp Ala Asn Thr Tyr Leu Arg Met Thr Arg Ala Leu Asp
275 280 285
Tyr Phe Asp Pro Ala Leu Asp Tyr Asp Gly Asn Leu Ser Lys Ala Leu
290 295 300
Ser Arg Ala Lys Ala Lys Phe Val Val Ile Ser Phe Thr Thr Asp Trp
305 310 315 320
Arg Phe Ser Pro Ala Arg Ser Arg Glu Ile Val Gln Ala Leu Leu Asp
325 330 335
Asn Ala Leu Pro Val Lys Tyr Ala Glu Val Thr Ser Ala His Gly His
340 345 350
Asp Ala Phe Leu Met Pro Asp Ala His Tyr His Ala Ile Met Arg Ala
355 360 365
Tyr Leu Glu Gln Ile Lys Val
370 375

<210> 17
<211> 711
<212> DNA
<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(711)

<400> 17

atg gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt　48
Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser
 1　　5　　10　　15

ctt tta ctg tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga　96
Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly
　　20　　25　　30

att aag cgc gaa gga ctc att gcg gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct　144
Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser
　　35　　40　　45

gac gtc ttt ttg ttc atc gcc ggc acc ttg ggc gtt gat ctt ttg tcc　192
Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser
 50　　55　　60

aat gcc gcg ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt ggc atc gct　240
Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala
65　　70　　75　　80

tac ctg tta tgg ttt gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac　288
Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn
　　85　　90　　95

aag gtg gaa gcg cca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc　336
Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro
　　100　　105　　110

gat gac acg cct ttg ggc ggt tcg gcg gtg gcc act gac acg cgc aac　384
Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn

```
        115                 120                 125
cgg gtg cgg gtg gag gtg agc gtc gat aag cag cgg gtt tgg gta aag   432
Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys
    130                 135                 140
ccc atg ttg atg gca atc gtg ctg acc tgg ttg aac ccg aat gcg tat   480
Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr
145                 150                 155                 160
ttg gac gcg ttt gtg ttt atc ggc ggc gtc ggc gcg caa tac ggc gac   528
Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp
                165                 170                 175
acc gga cgg tgg att ttc gcc gct ggc gcg ttc gcg gca agc ctg atc   576
Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile
            180                 185                 190
tgg ttc ccg ctg gtg ggt ttc ggc gca gca gca ttg tca cgc ccg ctg   624
Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu
        195                 200                 205
tcc agc ccc aag gtg tgg cgc tgg atc aac gtc gtc gtg gca gtt gtg   672
Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val
    210                 215                 220
atg acc gca ttg gcc atc aaa ctg atg ttg atg ggt tag               711
Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly
225                 230                 235
```

<210> 18

<211> 236

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 18

Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser
1 5 10 15
Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly
20 25 30
Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser
35 40 45
Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser
50 55 60
Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala
65 70 75 80
Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn
85 90 95
Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro
100 105 110
Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn
115 120 125
Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys
130 135 140
Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr
145 150 155 160
Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp
165 170 175
Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile
180 185 190
Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu
195 200 205
Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val
210 215 220
Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly

225　　230　　235

【書類名】　　要約書

【要約】

【課題】　メタノール資化性細菌を用いたＬ－リジン製造の効率を向上させること。

【解決手段】　生育にＬ－メチオニンを要求し、かつ、Ｌ－リジン生産能を有するメタノール資化性細菌を、メタノールを主要炭素源とする培地に培養し、培養物中にＬ－リジンを生産蓄積させ、該培養物からＬ－リジンを採取することにより、Ｌ－リジンを製造する。

【選択図】　なし

特願２００３－０２０５１３

出　願　人　履　歴　情　報

識別番号　　［０００００００６６］

１．変更年月日　　１９９１年　７月　２日
［変更理由］　　住所変更
住　所　　東京都中央区京橋１丁目１５番１号
氏　名　　味の素株式会社

２．変更年月日　　２００３年　５月１２日
［変更理由］　　名称変更
住所変更
住　所　　東京都中央区京橋１丁目１５番１号
氏　名　　味の素株式会社